

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-514017

(P2003-514017A)

(43) 公表日 平成15年4月15日 (2003.4.15)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	特許出願 (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
31/192		31/192	4 C 0 8 6
31/513		31/513	4 C 2 0 6
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21) 出願番号 特願2001-537949(P2001-537949)  
(86) (22) 出願日 平成12年11月15日 (2000.11.15)  
(85) 翻訳文提出日 平成14年5月15日 (2002.5.15)  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 3 1 4 1 0  
(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 3 5 9 5 6  
(87) 国際公開日 平成13年5月25日 (2001.5.25)  
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 6 5 , 5 4 3  
(32) 優先日 平成11年11月15日 (1999.11.15)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 アドバンスド リサーチ アンド テクノ  
ロジー インスティテュート, インコーポ  
レイティド  
アメリカ合衆国, インディアナ 46202,  
インディアナポリス, スイート 100, ウ  
ォーターウェイ プールバード 1100, オ  
フィス オブ テクノロジー トランスフ  
ァー  
(71) 出願人 マーシャル, マーク, スティーブン  
アメリカ合衆国, 46033 インディアナ州,  
カーメル, スプリース コート 1519  
(74) 代理人 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膝臓癌の治療のためのNSAIDの使用

(57) 【要約】

本発明は、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID)、特にス  
リングクまたはその類似体の使用を含む膝臓癌を治療す  
るための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 癌細胞を有効量のNSAIDに接触させることを含む膵臓癌細胞の生存度を低下させる方法。

【請求項 2】 前記細胞を有効感作量のNSAIDに接触させることを含む哺乳類の膵臓癌細胞の化学療法剤への感受性を高める方法。

【請求項 3】 前記NSAIDが、COX-2阻害剤であるスリダクまたはその類似体である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記哺乳類の癌細胞がヒト癌細胞である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】 前記スリダクまたはその類似体がヒト癌患者に投与される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】 前記癌患者が、化学療法剤での治療中である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 前記化学療法剤が、ゲムシタビンである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 前記スリダクまたはその類似体が経口投与される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】 (a) 膵臓癌細胞の第 1 の部分をヒト膵臓癌患者から単離するステップと；

(b) それらの生存度を測定するステップと；

(c) スリダクまたはその類似体を前記患者に投与するステップと；

(d) 膵臓癌細胞の第 2 の部分を前記患者から単離するステップと；

(e) 膵臓癌細胞の前記第 2 の部分の生存度を測定するステップと；

(f) ステップ (e) で測定した生存度をステップ (b) で測定した生存度と比較するステップとを含み、ステップ (e) での生存度の低下によって前記細胞が前記化学療法剤に感作されたことが示される、膵臓癌細胞を化学療法剤に感作させるCOX-2阻害剤であるスリダクまたはその類似体の能力を評価する方法。

【請求項 10】 ステップ (b) および (e) が前記化学療法剤の存在下で行なわれる請求項 9 に記載の方法。

(3)

【請求項 1 1】 前記化学療法剤が、ゲムシタビンおよび／または5-FUである請求項 1 0に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【０００１】

発明の背景

膵臓癌は、最も一般的な癌による死因として肺癌、結腸癌および乳癌に次ぐ順位を占めている(1)。膵臓癌は男性により一般的であり、６０歳から７０歳の間の男性が最も危険性が高い。膵臓癌の原因は不明である。

## 【０００２】

最も一般的な症状は体重の減少、腹痛および黄疸である。通常、体重の減少は深刻であり、その原因は完全には解明されていない。平均的な減少量は約２５ポンドである。癌が総胆管をふさぐと黄疸が起こる。膵臓癌の生存率は低い。膵臓癌は、悪性腫瘍が確認されるまでに身体の他の部分に広がって（転移して）いることが多い。平均余命は診断の時点から６ヶ月あまりである。

## 【０００３】

腫瘍は、取り除くことができない生命にかかわる組織を冒しているか、遠く離れた部位にまで広がっているために、手術によって取り除くことができないことが多い。化学療法および放射線療法を腫瘍に対して用いることができるが、これらの治療法が役立たないことが多い。

## 【０００４】

非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）の数は、別個の分類を形成するほどまで増加している。アスピリンに加えて米国で入手可能なNSAIDは、関節炎の治療用のメクロフェナム酸ナトリウム、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン、インドメタシン、ピロキシカム、スリンダクおよびトルメチン、痛覚消失用のメフェナム酸およびゾメピラックならびに関節炎と痛覚消失両用のイブプロフェン、フェノプロフェンおよびナプロキセンを含む。イブプロフェン、メフェナム酸およびナプロキセンは月経困難症の管理にも用いられる。

## 【０００５】

NSAIDの臨床上的有用性は、多くの副作用のために制限されている。フェニルブタゾンは肝壊死および肉芽腫性肝炎に、スリンダク、インドメタシン、イブプロフェンおよびナプロキセンは肝炎および胆汁うっ滞性肝炎に関連付けられてい

る。血清アミノトランスフェラーゼ、特にアラニンアミノトランスフェラーゼの一時的な上昇が報告されている。アスピリンを含むこれらの薬物の全てはシクロオキシゲナーゼを阻害し、それによって次には、糸球体濾過率ならびに腎臓のナトリウムおよび水分排泄の調節を助けるプロスタグランジン類の合成が阻害される。このため、NSAIDは、水分貯留をもたらし、ナトリウムの排泄を減少させ、高カリウム血症、乏尿症および無尿症を引き起こす可能性がある。また、これらの薬物の全てが消化性潰瘍を引き起こす可能性がある。Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Pub. Co., Easton, PA (18th ed., 1990) 1115-1122頁を参照。

#### 【0006】

癌、特に結腸癌に対するNSAIDの効果については多くの文献がある。たとえば、H. A. ワイス (Weiss) ら、Scand J. Gastroent., 31, 137 (1996) (suppl. 220) およびシフ (Shiff) ら、Exp. Cell Res., 222, 179 (1996) を参照。さらに最近では、B. ベッロシッロ (Bellosillo) ら、Blood, 92, 1406 (1998) が、アスピリンおよびサリチル酸塩はインビトロでB細胞CLL細胞の生存度を低下させるが、インドメタシン、ケトロラク (ketoralac) およびNS-398は低下させないと報告している。スリンダクは、結腸癌の治療のための複合治療において研究されている。H. M. ヴェルヘル (Verheul) ら、Brit. J. Cancer, 79, 114 (1999); F. A. シニクロープ (Sinicrope) ら、Clin. Cancer Res., 2, 37 (1996); および M. ムーゲン (Mooghen) ら、J. Pathol., 156, 394 (1988) を参照。

#### 【0007】

C. P. ダッフィー (Duffy) ら、Eur. J. Cancer, 34, 1250 (1998) は、ある化学療法薬の細胞傷害作用が、ある非ステロイド系抗炎症剤と組み合わせると高まることを報告した。ヒト肺癌細胞およびヒト白血病細胞に対して観察されたこの効果は非常に特異的で予測不可能であった。すなわち、NSAIDと薬剤の組合せには効果的なものあれば、効果がないものもあった。引き出された唯一の結論は、その効果はNSAIDのシクロオキシゲナーゼ阻害活性によるものではないということであった。

#### 【0008】

ダッフィー (Duffy) のグループは、抗がん薬となり得る“MRPの基質”と抗がん薬の効力を強めるNSAIDとの組合せを対象とするPCT出願を1997年10月24日に行った。請求項に列挙されたNSAIDは、アセメタシン、インドメタシン、スリンダク、スリンダクスルフィド、スリンダクスルホン、トルメチンおよびゾメピラックである。ナプロキセンおよびピロキシカムは不活性であると報告された。

#### 【0009】

したがって、癌を抑制し、比較的非毒性の薬剤を用いて抗がん薬の効力を強めるための方法が継続して必要とされている。

#### 発明の要旨

1つの局面では、本発明は、膵臓癌に冒された哺乳類に前記哺乳類の膵臓癌細胞の生存度を阻害するのに有効な量のNSAID、好ましくはスリンダク((Z)-5-フルオロ-2-メチル-1-[[4-(メチルスルフィニル)フェニル]メチレン]-1H-インデン-3-酢酸)またはその類似体であって、好ましくはCOX-2阻害剤であるものを投与することを含む膵臓癌を治療するための治療方法を提供する。本発明はまた、細胞を有効感作量のNSAID、好ましくはスリンダク、または前記その類似体に接触させることを含むヒト膵臓癌細胞の化学療法剤への感受性を高める方法を提供する。これにより、本発明は、有効量のNSAID、好ましくはスリンダクまたは前記その類似体を膵臓癌に冒され化学療法(「抗腫瘍性」)剤による治療中である患者に投与する、膵臓癌に冒されたヒトまたは他の哺乳類の治療のための治療方法を提供する。

#### 【0010】

スリンダクは、ゲムシタビンまたは5-FUのような膵臓癌に対して有効な1つ以上の化学療法剤と共に投与されるのが好ましい。

#### 【0011】

膵臓癌細胞を化学療法剤に感作させるスリンダク的能力を評価する方法もまた提供される。このアッセイ方法は、(a)膵臓癌細胞の第1の部分ヒト癌患者から単離するステップと；(b)それらの生存度を測定するステップと；(c)スリンダクまたは前記その類似体を前記患者に投与するステップと；(d)膵臓

癌細胞の第2の部分の前記患者から単離するステップと；（e）膵臓癌細胞の第2部分の生存度を測定するステップと；（f）ステップ（e）で測定した生存度とステップ（b）で測定した生存度とを比較するステップとを含み、ステップ（e）での生存度の低下によって細胞が前記化学療法剤に感作されたことが示される。

#### 【0012】

膵臓癌細胞が、膵臓癌に冒された哺乳類の血液から由来する場合と同様に、ステップ（b）および（e）は化学療法剤の存在下で行うのが好ましい。

#### 【0013】

これにより、膵臓癌の治療を受ける予定または治療中の癌患者を迅速に評価し、患者が化学療法とスリンダクまたはその類似体の投与との併用によって利益を得るかどうかを調べることができる。

#### 【0014】

本明細書中に用いる用語“スリンダク”およびスリンダクの類似体は、スリンダクスルホン、スリンダクスルフィドのような代謝物および製薬上許容可能なその塩を含む。

### 図面の簡単な説明

図1。膵臓腺癌および対応する正常組織の代表的な免疫プロットの複写写真。正常（N）組織を有する3人を含む6人の患者から得た腫瘍（T）検体から溶解物を調製した（試料番号は表1に記載のものに対応する）。図示するように特異的なCOX-2、COX-1、p21<sup>ras</sup>およびアクチン抗体での免疫プロット法によって溶解物を分析した。COX-2免疫プロットの陽性対照（+）はリポ多糖（LPS）で処理したマウスのマクロファージ細胞系であるRaw 264.7から調製された細胞溶解物である。陰性対照（-）は、COX-1もCOX-2もどちらも発現させない結腸癌細胞系HCT116である。

#### 【0015】

図2。患者試料におけるCOX-2発現率。表1の黒丸で示す全ての腫瘍試料および白丸で示す正常組織についてのCOX-2発現率の値がプロットされている。平均値、中央値および範囲が示されている。膵臓の腫瘍／正常組織のセットのCOX-2

発現率を図内挿入図に示す (n=11)。対応する黒丸で示す腫瘍値と白丸で示す正常値とが線によって結ばれている。腫瘍検体と正常検体とのCOX-2発現の差異は、統計的に有意であると判断された (P=0.004)。

#### 【0016】

図3。膵臓腫瘍細胞系におけるCOX-2の発現。A) 免疫ブロット分析によって検出されたヒト膵臓細胞系におけるCOX-2発現。各細胞系のK-ras変異状況も示す。B) 細胞系BxPC-3をMEK阻害剤PD98059またはDMSOで10時間処理した後の活性化MAPキナーゼおよびCOX-2の発現レベル。燐酸化活性Erk 1/2 Mapキナーゼをリン酸特異的Mapキナーゼ抗体で検出した。C) 3つのハムスター膵臓細胞系でのCOX-2発現の比較。D27は非悪性の親細胞系であり、これからD27/K-rasおよびB12/13という形質転換系を得た。COX-2をプローブした後、ブロットを剥離してアクチンを再プローブし、タンパク質負荷が同等であることを示した。D) COX-2発現の誘導性。血清飢餓細胞を図示された時間10%FCSで刺激し、続いて細胞溶解を行なった。COX-2の発現を増殖細胞 (Gr)、血清飢餓細胞 (0h) およびFCS刺激細胞から調製した溶解物中で免疫ブロット分析によって測定した。

#### 【0017】

図4。膵臓腫瘍細胞系の増殖に対するCOX阻害剤の効果。黒い棒で示す細胞系BxPC-3および斜線の棒で示すPaCa-2を、DMSO (対照) あるいは図示された濃度のスリンダク (A)、インドメタシン (B) またはNS-398 (C) の存在下で平板培養した。3日目に、2つのウェル内の細胞を計数し、DMSOの存在下で増殖する細胞の数の百分率で表した。少なくとも2回の独立した実験からの平均値 $\pm$ 標準偏差を示す。

#### 【0018】

図5。プロスタグランジンE<sub>2</sub>の産生。A) 膵臓腫瘍細胞系におけるPGE<sub>2</sub>レベル。指数関数的に増殖する細胞を無血清培地で15  $\mu$ Mアラキドン酸で1時間インキュベートした後、培養上清におけるPGE<sub>2</sub>のレベルを酵素免疫測定法によって測定した。PGE<sub>2</sub>の産生をタンパク質濃度に正規化した。表示された結果は、2回の独立した実験からの平均値 $\pm$ 標準偏差である。B) PGE<sub>2</sub>の産生に対するCOX阻害剤の効果。BxPC-3細胞系をDMSOまたは2種類の濃度のCOX阻害剤 (100  $\mu$ Mのスリン



ダク、10  $\mu$ Mのインドメタシンおよび10  $\mu$ MのNS-398を黒い棒で示し、250  $\mu$ Mのスリンダク、100  $\mu$ Mのインドメタシンおよび50  $\mu$ MのNS-398を点描の棒で示す)で24時間インキュベートした後、細胞溶解を行い、酵素免疫測定法によって細胞内のPGE<sub>2</sub>を測定した。COX阻害剤によるPGE<sub>2</sub>阻害率を示す。データは、少なくとも2回の独立した実験からのものである。

#### 【0019】

図6は、膵臓腫瘍細胞系BxPCの増殖に対するスリンダクとゲムシタビンとの組合せの効果を表すグラフである。

#### 【0020】

図7は、膵臓腫瘍細胞系PaCa-2の増殖に対するスリンダクとゲムシタビンとの組合せの効果を表すグラフである。

#### 発明の詳細な説明

早期診断の実現が困難なものと膵臓癌の攻撃的な性質により、膵臓癌患者の生存率は低い。膵臓癌の治療にはほとんど選択肢がないので、薬物療法のための可能性のある目的物を特定することが重要である。膵臓の腫瘍形成についてより多くの識見を得るために、膵臓腫瘍は、遺伝子的な損傷を検出するために分子レベルで分析されてきた。K-ras遺伝子内で活性化する変異が、膵臓癌腫の90%までにおいて検出されており、Ras経路の活性化が膵臓癌の発達において重要であることを示唆している(2)。現在、膵臓癌患者についての実験的な化学療法の戦略は、Rasシグナル形質導入経路を目的物とする薬物を含んでいる。

#### 【0021】

多数の証拠が、酵素シクロオキシゲナーゼ(COX)、具体的にはCOX-2が有望な化学療法の目的物であり得ることを示唆している。たとえば、疫学的研究によって、アスピリンまたは他の非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)の長期的使用によって結腸癌の危険性が40~50%減少し得ることが示されている(3)。NSAIDはまた、動物モデルシステムにおいて化学的に誘導された結腸癌腫を阻害し得る(4)。NSAIDはアラキドン酸のプロスタグランジンおよび他のエイコサノイド類への変換における鍵酵素であるシクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害することが知られているので、これらの研究は、COXが炎症における既知の役割に加えて発癌現象

において役割を果たしている可能性があることを示している。COX-1およびCOX-2と呼ばれるCOXの2つの異性体が確認されている。COX-1は構成的に発現し、COX-2は血清、ホルボールエステルおよび増殖因子のような分裂促進性の刺激によって誘導される(5、6)。近年、COX-2の発現は数種類のヒト癌において高くなることが示されており、COX-2の存在が癌の発達と相関していることを示唆している(7~11)。COX-2を発癌現象と直接的に結びつけるさらなる研究には、COX-2を発現するヒト結腸癌細胞は侵入性を高めるという観察(12)や大腸上皮細胞において発現したCOX-2はアポトーシスを阻害するという観察(13)が含まれる。結腸癌細胞におけるCOX-2の発現は血管新生因子の生成を刺激することによって共培養された内皮細胞の血管新生を促進することにもわかっている(14)。さらに、結直腸癌に至る遺伝性の病気であるヒト家族性腺腫性ポリポージス(FAP)についてのマウスモデルによって、COX-2を結腸直腸の腫瘍形成と結びつける直接的な遺伝学的証拠が提供された。すなわち、このシステムではCOX-2遺伝子ノックアウトおよび特異的COX-2阻害剤が形成される腸ポリープの数を減少させることがわかった(15)。

#### 【0022】

腫瘍形成性Rasの存在は、H-ras形質転換ラットの腸および乳房上皮細胞ならびに非小細胞性肺癌細胞系におけるCOX-2発現の誘導と関連付けられてきた(16~18)。本発明者らの知る限りでは、腫瘍形成性RasとCOX-2発現との関連は生体内では検討されていない。膵臓腫瘍でK-ras遺伝子内で活性化する変異の頻度が高いので、本発明者らは生体内で腫瘍形成性RasとCOX-2発現との関係を調べることができるはずである。本研究では、原発性ヒト膵臓腺癌におけるCOX-2タンパク質のレベルを評価した。本発明者らは、COX-2発現が膵臓腫瘍および膵臓癌細胞系のK-ras変異状況と相関するかどうかをさらに調べた。原発性膵臓腫瘍および細胞系における高レベルのCOX-2タンパク質を示すデータを考慮して、本発明者らはCOX阻害剤であるスリンダク、インドメタシンおよびNS-398のヒト膵臓腫瘍細胞系での細胞増殖およびプロスタグランジンE<sub>2</sub>産生に対する効果について試験した。

#### 【0023】

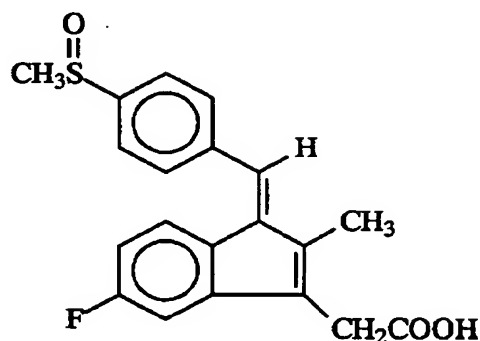
シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 発現は、数種類のヒト癌でアップレギュレートされ、発癌現象とも直接的に結びつけられた。膵臓癌におけるCOX-2の役割を調査するため、本発明者らは、原発性ヒト膵臓腺癌 (n=23) および対の正常隣接組織 (n=11) におけるCOX-2タンパク質発現を免疫ブロット分析によって評価した。COX-2発現は正常な膵臓組織に比べて膵臓腫瘍検体で非常に高いことがわかった。膵臓腫瘍で観察される高レベルのCOX-2タンパク質が腫瘍形成性K-rasの存在と相関するかどうかを調べるため、本発明者らは、腫瘍および対応する正常組織のサブセットでのK-ras変異状況を測定した。腫瘍形成性K-rasの存在は、分析した膵臓腺癌で発現したCOX-2タンパク質のレベルとは相関していなかった。これらの観察は、ヒト膵臓腫瘍細胞系のパネルにおいても確認された。さらに、最も高いレベルのCOX-2を発現する膵臓腫瘍細胞系 (BxPC-3) では、COX-2発現はErk 1/2 Mapキナーゼ活性化とは無関係であることが示された。COX-2と腫瘍形成性K-ras発現との間の相関関係の欠如は、Ras活性化が膵臓腫瘍細胞におけるCOX-2発現の誘導には十分であり得ず、Ras以外のシグナル経路の異常な活性化がCOX-2発現をアップレギュレートするのに必要となり得ることを示唆している。本発明者らはまた、COX阻害剤であるスリンダク、インドメタシンおよびNS-398がCOX-2陽性 (BxPC-3) およびCOX-2陰性 (PaCa-2) の両方の膵臓腫瘍細胞系における細胞増殖を阻害したことを報告する。しかしながら、インドメタシンおよびNS-398による細胞増殖の抑制は、PaCa-2細胞系よりもBxPC-3細胞系における方が非常に大きかった (それぞれ $P=0.004$ および $P<0.001$ )。さらに、この3種のCOX阻害剤は、BxPC-3細胞系におけるプロスタグランジン $E_2$  (PGE $_2$ ) のレベルを低下させた。総合すると、本発明者らのデータは、COX-2が膵臓腫瘍形成で重要な役割を果たし、したがって膵臓癌治療のために有望な化学療法の目的物となり得ることを示唆している。

#### 【0024】

スリンダク ((Z)-5-フルオロ-2-メチル-1-[[4-(メチルスルフィニル)フェニル]メチレン]-1H-インデン-3-酢酸) は以下の化学式を有し、メルク (Merk) 社からクリノリル (Clinoril (登録商標)) として入手可能である。

#### 【0025】

## 【化 1】



## 【0026】

スリンダクは、骨関節炎、慢性間接リウマチ、強直性脊椎炎、急性肩痛および急性痛風性関節炎の徴候および症状の急性および長期的軽減に示されるインデン系抗炎症剤である。スリンダクはまた鎮痛および解熱特性を有する。その作用の正確な機構は不明であるが、スルフィド代謝物がプロスタグランジン合成を阻害し得ると考えられる。スリンダクは経口投与すると約90%吸収される。絶食中の患者で約2時間、食べ物と共に投与した場合は3時間から4時間でピーク血漿レベルに達する。スリンダクの平均半減期は7.8時間であり、スルフィド代謝物の平均半減期は16.4時間である。スリンダクは機能性分類ⅠⅤの関節炎（無能力、ほとんどまたは完全に寝たきり、あるいは車椅子状態；ほとんどまたは全くセルフケアできない）、アスピリンまたは他の非ステロイド系抗炎症剤によって急に引き起こされる急性喘息発作、じんま疹または鼻炎の患者および薬物に敏感な患者には禁忌されている。

## 【0027】

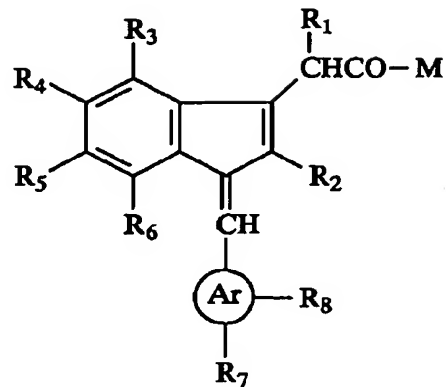
スリンダクの合成ならびにその類似体（代謝物および塩を含む）は、たとえば、米国特許第3,654,349号および第3,647,858号ならびに Fed. Proc., 31, 377 (1972); Drug. Metab. Dispos., 1, 721 (1972)に開示されている。

## 【0028】

たとえば、スリンダクの類似体は化学式(I)の置換されたインデニル酢酸を含む。

【0029】

【化2】



【0030】

式中、【化3】は、アリーールまたはヘテロアリーール、たとえば1-3, N、0およ



【0031】

び／またはS原子を含む5、6または7員ヘテロアリーール環であってもよく；

R<sub>1</sub>は水素、低級(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルまたはハロゲン化低級アルキルであってもよく；

R<sub>2</sub>は、水素または(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)アルキルであってもよく；

R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>およびR<sub>6</sub>は、それぞれ水素、アルキル、(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>)アシルオキシ、アルコキシ、ニトロ、アミノ、アシルアミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ジアルキルアミノアルキル、スファミル(sufamyl)、アルキチオ(alkythio)、メルカプト、ヒドロキシ、ヒドロキシアルキル、アルキルスルホニル、ハロゲン、シアノ、カルボキシル、アルコキシカルボニル、カルバミド、ハロゲノアルキル、シクロアルキルまたはシクロアルコキシであってもよく；

R<sub>7</sub>は、アルキルスルフィニルまたはアルキルスルホニルであってもよく；

R<sub>8</sub>は、水素、ハロゲン、ヒドロキシ、アルコキシまたはハロアルキルであってもよく；

Mは、ヒドロキシ、低級アルコキシ、置換された低級アルコキシ、アミノ、ア

ルキルアミノ、ジアルキルアミノ、N-モルホリノ、ヒドロキシアルキルアミノ、ポリヒドロキシアルキルアミノ、ジアルキルアミノアルキルアミノ、アミノアルキルアミノおよびMeがカチオンであるOMe基；ならびに製薬上許容可能なその塩であつてもよい。

#### 【0032】

アルキルは、低級アルキル、すなわち(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)アルキルであるのが好ましい。  
アシルは、(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)アシルであるのが好ましい。

#### 【0033】

インドメタシンおよびNS-398を含む他のNSAIDもまた、以下に述べるように膵臓腫瘍細胞系の増殖を阻害し、単独でまたは好ましくはスリンダクと組み合わせて本発明の方法に用いることができる。

#### 【0034】

ゲムシタビン（ゲムシタビンHClまたはジェムザール(Gemzar（登録商標））は、2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオロシチジン-HCl (B-異性体)であり抗腫瘍ヌクレオシド類似体である。これは、限局性または転移性膵臓癌（膵臓の腺癌）の治療のために、約500~4000mg/m<sup>2</sup>/週の用量で最高7週/サイクル間、注射または注入により投与することができる。これはまた、5-FUのような他の抗がん剤と共に投与することもできる。PDR (53rd ed., 1999)、1578-1582頁を参照。

#### 【0035】

スリンダクまたはNS-398単独およびゲムシタビンとの組合せの膵臓腫瘍細胞Bx PC-3およびPaCa-2の増殖に対する効果を調べた。この薬物の組合せでの処理によって、いずれか一方の化合物単独よりも大きく両細胞系の増殖が阻害された。抗炎症特性を有するナツシロギク（feverfew）の活性成分であるパセノライドもまたPaCa-2細胞の増殖を阻害し、ゲムシタビンと組み合わせるといずれか一方の化合物単独でよりも大きな阻害効果を示すことがわかった。パセノライド処理によってNF- $\kappa$ BのDNA結合活性が阻害された。これらの結果は、抗炎症薬が膵臓腫瘍に対するゲムシタビンの有効性を高め得ることを示唆している。

#### 【0036】

癌すなわち膵臓癌の急性または慢性的治療管理におけるスリンダク、その類似

体またはその組合わせの予防または治療用量は、治療する固形腫瘍、用いられる化学療法剤または他の抗がん療法および投与経路のような癌の段階によって異なる。用量およびおそらくは投与の頻度もまた、個々の患者の年齢、体重および反応によって異なる。一般に、本明細書中に記載の条件に対するスリンドクおよびその類似体の1日の全用量の範囲は、1回または分割の用量で約50mgから約2500mgである。好ましくは、1日の用量は1回または分割の用量で約100mgから約1500mg、最も好ましくは、1日当たり約150~500mgであるのがよい。患者を治療管理する際、治療は低用量から開始し、患者の全体的な反応に合わせて増加させるのがよい。幼児、小児、65歳を超える患者および腎機能または肝機能に障害のある患者は、最初は低用量を投与され、全体的な反応および血中濃度に基づいて滴定されることがさらに推奨される。これらの範囲外の投与量を用いることが必要となり得る場合もある。さらに、臨床医または治療する医師は、個々の患者の反応によって、どのように、いつ、治療を中断、調整または終了すればよいかが分かる。用語“有効量”または“有効感作量”は、上記の投与量および投与頻度のスケジュールに含まれている。

#### 【0037】

患者に有効な投与量のスリンドクを提供するのにいかなる適切な投与経路を使用してもよい。たとえば、経口、経直腸、非経口（皮下、静脈内、筋肉内）、髄腔内、経皮などの投与形態を使用してよい。投与の形態は、タブレット、トローチ、分散液、懸濁液、溶液、カプセル、貼付剤などを含む。スリンドクは、化学療法の適用の前、同時または後、あるいは化学療法の全期間または一時期に継続的に、すなわち毎日投与してもよい。スリンドクは、抗がん化学療法剤を輸送するために用いられるのと同じ担体またはビークルと組み合わせてもよい場合がある。

#### 【0038】

このため、本発明の化合物は、不活性希釈剤または同化可能な可食性の担体のような製薬上許容可能なビークルと組み合わせて、たとえば経口で全身に投与してもよい。これらは、硬質または軟質の外被のゼラチンカプセルに封入してもよいし、圧縮してタブレットにしてもよく、または患者の食事の食べ物に直接組み

込んでもよい。経口治療的投与には、活性化合物を1つ以上の賦形剤と組み合わせて摂取可能なタブレット、パッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、オブラートなどの形態で用いてもよい。このような組成物および調剤は、少なくとも0.1%の活性化合物を含んでいるのがよい。この組成物および調剤の割合はもちろん変えてもよく、所定の単位投与形態の重量の約2%から約60%の間であるのが好都合であるかもしれない。このような治療的に有用な組成物における活性化合物の量は、有効投与量のレベルが得られるようなものである。

#### 【0039】

タブレット、トローチ、丸剤、カプセルなどは以下のものを含んでもよい。トラガカントゴム、アカシア、トウモロコシデンプンまたはゼラチンのような結着剤；リン酸ジカルシウムのような賦形剤；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、アルギン酸などのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような湿潤剤；およびスクロース、フルクトース、ラクトースまたはアスパルテームのような甘味剤あるいはペパーミント、ウィンターグリーン油またはチェリー香料のような着香剤を添加してもよい。単位投与形態がカプセルの場合は、上記の種類の物質に加えて植物油またはポリエチレングリコールのような液体担体を含んでもよい。剤皮として、あるいは固形の単位投与形態の物理的形態を変更するために、種々の他の物質が存在し得る。たとえば、タブレット、丸剤、またはカプセルをゼラチン、ロウ、シェラックまたは砂糖などで被膜してよい。シロップまたはエリキシルは、甘味剤としてのスクロースまたはフルクトース、防腐剤としてのメチルおよびプロピルパラベン、チェリーまたはオレンジ香味のような色素および香料といった活性化合物を含んでもよい。もちろん、いかなる単位投与形態の調製に用いられるいかなる物質であっても、製薬上許容可能であり、使用される量で実質的に非毒性でなければならない。さらに、活性化合物は徐放性製剤またはデバイスに組み込まれていてもよい。

#### 【0040】

活性化合物はまた、注入または注射によって静脈内または腹腔内に投与してもよい。活性化合物の溶液またはその塩は、水中で調製したり、任意には非毒性表



面活性剤と混合することができる。分散液はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチンおよびそれらの混合物ならびに油で調製することができる。通常の保存および使用条件下では、これらの調剤は微生物の増殖を防止するために防腐剤を含む。

#### 【0041】

注射または注入用に適切な製薬投与形態として、無菌水溶液または分散液、あるいは無菌注射可能または注入可能溶液または分散液の即時調製に適合し、任意にリポソームにカプセル化された活性成分を含む無菌粉末であってもよい。いずれの場合も、最終的な投与形態は、製造および保存の条件下で無菌、流体および安定していなければならない。液体担体またはビークルは、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなど）、植物油、非毒性グリセリルエステルおよびそれらの適切な混合物を含む溶剤または液体分散溶媒であり得る。たとえば、リポソームの形成、分散液の場合には、必要な粒子サイズの維持、または表面活性剤の使用によって適切な流動性を維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌および抗真菌剤、たとえば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって行なうことができる。多くの場合、等張剤、たとえば、砂糖、緩衝剤または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。吸収を遅らせる薬剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に用いることにより、注射可能な組成物の吸収を長期間にわたり行なうことができる。

#### 【0042】

無菌注射可能溶液は、必要量の活性化合物を上に掲げた種々の他の成分を有する適切な溶剤に組み入れることによって調製され、必要に応じて、フィルター殺菌を行なう。無菌注射可能溶液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥法であり、これらの方法により、予め殺菌濾過された溶液に存在する活性成分と付加的な望ましい成分との粉末を製造する。

#### 【0043】

スリンダクおよびその類似体の化合物の有用な投与量は、それらのインビトロ

活性と動物モデルでのインビボ活性とを比較することによって決定することができる。マウスおよび他の動物での有効投与量をヒトに外挿する方法は当該分野で公知である；たとえば米国特許第4,938,949号を参照。

#### 【0044】

以下の物質および方法を使用した下記の詳細な実施例を参照して本発明を説明する。

#### 【0045】

1. 患者試料 インディアナ大学組織調達研究所 (Indiana University Tissue Procurement Laboratory) と、国立がん研究所 (National Cancer Institute) の資金援助を受けるコーパレイティブ・ヒューマン・ティッシュ・ネットワーク (Cooperative Human Tissue Network (CHTN)) から保存された組織を入手した。合計23の原発性ヒト膵臓癌検体を本研究で分析した。対応する対の正常隣接組織を患者の11人から得た。患者は化学療法の前歴がないことを基準にして選択した。組織を外科的に切除して1時間以内に液体窒素中で凍結し、その後-80°Cで保存した。検体のサブセットからパラフィン切片を調製した。本研究で用いた全ての腫瘍検体は病理医による検査を受け、原発性膵臓腺癌に分類された。本研究については施設内治験審査委員会 (Institutional Review Board (IRB)) の承認を得た。

#### 【0046】

2. 免疫ブロット 凍結した組織をRIPA溶解緩衝液 (PBS、1%NP40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、1mM PMSF、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、20mM ベータ-グリセロリン酸、1mMフッ化ナトリウム、ペプスタチン (1 μg/ml)、アプロチニン (20 μg/ml)、およびロイペプチン (1 μg/ml) で素早く均質化した。13,000×gで10分間の遠心分離によって溶解物を清澄化し、次いで試料緩衝液中で煮沸した。BCAタンパク質定量キット (ピアス社 (Pierce)) を用いてタンパク質濃度を測定した。等量の総タンパク質を10%のゲル (ノベックス社 (Novex)) でSDS-PAGEによって分解し、イモビロンP膜 (MSI社) に移した。一次抗体COX-1 (C-20、サンタクルスバイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology))、COX-2 (C20、サンタクルスバイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology))、p

21<sup>ras</sup> (pan-ras Ab-3、オンコジーンサイエンス社 (Oncogene Science) )、アクチン (広範囲のアクチンイソ型を認識するC-11、サンタクルスバイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology) ) またはリン酸特異的Mapキナーゼ抗体 (ニューイングランドバイオラボ社 (New England Biolabs) ) を製造業者の推奨する通りに用いてブロットをプローブした。ECL (アマシャム社 (Amersham) ) によってバンドを視覚化し、濃度測定によって定量化した。COX-2の量を陽性対照 (リポ多糖 (LPS) で刺激したマウスのマクロファージ細胞系Raw 264.7から調製した3  $\mu$ gの細胞溶解物) の割合として表した。それぞれCOX-1およびCOX-2抗体によるCOX-1およびCOX-2の特異的認識を、ペプチド阻害実験によって確認した (データは示されていない) 。

#### 【0047】

3. 免疫組織化学 アビジン-ビオチン複合体法(19)を用いてホルマリン固定のパラフィン包埋切片5  $\mu$ mに免疫化学組織染色を行なった。COX-2発現の評価に一次ポリクローナル抗体を用いた (オックスフォードバイオメディカルリサーチ社 (Oxford Biomedical Research, Inc.)、Oxford, MI; 希釈度 1:100)。3,3'-ジアミノベンジジン (DAB) を色原体として用い、0.2%メチルグリーンを対比染色として用いた。陽性および陰性対照を並行して実施し、適切な結果が出た。

#### 【0048】

4. K-ras変異分析 組織を溶解緩衝液 (50 mM トリス pH 8.0、100 mM EDTA、100 mM NaCl、1% SDS、0.5 mg/ml プロテイナーゼK) で55°Cで一晩インキュベートすることによってゲノムDNAを調製した。RNase (0.1 mg/ml) を添加し、37°Cで2時間インキュベーションを続けた。次いで、試料をフェノール、フェノール:クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿させた。再懸濁したゲノムDNA (0.5  $\mu$ g) のK-rasエクソン1をPCRによって増幅した (5' プライマー=5'-ATGACTGAATATAAACTTGT-3' (配列識別番号: 1) ; 3' プライマー=5'-CTCTATTGTTGGATCATATT-3') (配列識別番号: 2) (20)。K-ras変異特異的オリゴヌクレオチド (オンコジーンリサーチプロダクツ社 (Oncogene Research Products) ) を利用してドットブロットハイブリダイゼーションによりPCR増幅産物のK-rasコドン12での変異

を検出した (21)。精製したPCR増幅産物を配列決定することによりK-rasコドン13での変異を検出した。

#### 【0049】

5. 統計的分析 ノンパラメトリックの符号付き順位検定により、癌検体と対応する正常な隣接組織との間で統計的に有意なCOX-2タンパク質の増加の存在を測定した。二元配置の分散分析 (ANOVA) を用いて、COX阻害剤の存在下でのBxPC-3細胞系とPaCa-2細胞系との細胞増殖率の平均値の差異を調べた。

#### 【0050】

6. 細胞系 ヒト膵臓腫瘍細胞系 (AsPC-1、BxPC-3、Capan-1、Capan-2、HPAF-11、Hs766T、PaCa-2およびPANC-1) をアメリカンタイプ培養コレクション (American Type Culture Collection (ATCC、Rockville、MD)) から入手し、推奨される通りに培養した。ハムスターの膵臓細胞系 (D27、D27/K-ras、B12/13) を上記のように培養した (22、23)。阻害剤研究のために、BxPC-3細胞をMapキナーゼキナーゼ (MEK) 阻害剤PD98059 (40  $\mu$ M) またはDMSOで10時間処理した。溶解物を調製し、上記のように解析した。

#### 【0051】

7. 細胞増殖 細胞を、DMSO、スリダク (シグマ社 (Sigma))、インドメタシン (シグマ社 (Sigma))、またはNS-398 (バイオモル社 (Biomol)) の存在下で6ウェルプレートで二重に平板培養した。3日目に細胞をトリプシン処理してトリパンブルーで染色し、血球計数器を用いて計数した。細胞数を平均することによって細胞増殖を測定し、DMSO対照試料の細胞数の割合として表した。

#### 【0052】

8. プロスタグランジンE<sub>2</sub>アッセイ 細胞を12ウェルプレートで平板培養した。3日目に培地を吸引し、無血清培地の15  $\mu$ Mアラキドン酸と交換し、1時間後酵素免疫測定法 (バイオトラク (Biotrak)、アマシャム社 (Amersham)) によって製造業者の推奨する通りにPGE<sub>2</sub>について培養上清のアッセイを行なった。産生されたPGE<sub>2</sub>の量をタンパク質濃度に正規化した。細胞を12ウェルプレートでCOX阻害剤の存在下で24時間平板培養した後、細胞溶解して酵素免疫測定法 (Biotrak) によって製造業者の推奨する通りに定量を行なうことにより、細胞

内のPGE<sub>2</sub>レベルを測定した。細胞内のPGE<sub>2</sub>レベルを測定するため、アッセイの前に細胞をアラキドン酸でプレインキュベートしなかった。

### 【0053】

9. 略語 COX、シクロオキシゲナーゼ；Erk 1/2 MAP キナーゼ (Erk、MAPK)、細胞外シグナル制御キナーゼ1および2マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ；MEK、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ；NSAIDS、非ステロイド系抗炎症薬；PGE<sub>2</sub>、プロスタグランジンE<sub>2</sub>；PMA、ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート。

### 実施例 1

#### ヒト膵臓腺癌におけるCOX-2発現

原発性ヒト膵臓腺癌 (n=23) および対の正常隣接組織 (n=11) で免疫ブロット分析によってCOX-2タンパク質の発現を調べた。対の正常隣接組織を有する3人を含む6人の患者から調製した溶解物の代表的な免疫ブロットを図1に示す。各正常検体では検出不能なレベルのCOX-2タンパク質が観察された。対照的に、膵臓腫瘍組織のCOX-2タンパク質発現は検出不能 (試料#21) から僅か／中程度 (試料#12、14、20)、高レベル (試料#9、22) までの範囲にわたった。COX-1タンパク質は膵臓腫瘍および正常組織の両方で観察されたが、発現のレベルは一定せず、腫瘍検体で一貫して高いわけではなかった (図1)。腫瘍および対応する正常組織の両方において、同様のレベルのp21<sup>ras</sup>およびアクチンの発現が見られた (図1)。

### 【0054】

COX-2発現率を、濃度測定分析を行なうことにより全ての組織検体について測定し、100%に設定した陽性対照を基準として計算した (表1および図2のグラフ)。本研究用の陽性対照は、リポ多糖 (LPS) で刺激したマウスのマクロファージ細胞系Raw 264.7であり、COX-2発現を誘導することが以前に明らかになっていた (22)。膵臓腺癌で広範囲 (0~93%) のCOX-2発現が見られたのに対し、正常組織ではCOX-2発現の範囲は非常に狭かった (0~4.3%)。COX-2発現の平均値および中央値は共に腫瘍試料の方が高く、COX-2発現は正常組織に比べて膵臓腺癌で高くなることを示唆している。膵臓腫瘍と対応する正常組織との間のCOX-2

発現の差異は、統計的に有意であると判断された ( $P=0.004$ ) (図2、図内挿入図)。COX-2陽性および陰性試料は、それぞれCOX-2発現の割合が5%より高いまたは低い試料と定義した。これは免疫ブロットでの視覚的検出と密接に対応している。これらの基準によると、組織セットの11の腫瘍試料のうち6試料(55%)がCOX-2陽性であった。同様に、分析した全腫瘍検体23のうち13の検体(56%)がCOX-2陽性であり、対照的に正常組織試料 ( $n=11$ ) は全てCOX-2陰性であった。

#### 【0055】

膵臓腫瘍検体の免疫組織化学染色によって、COX-2発現は癌腫細胞に局限され、腫瘍の間質画分 (stromal compartment) では検出できないことが示された。

#### 実施例2

##### 膵臓腫瘍および細胞系におけるCOX-2発現およびK-ras変異

COX-2発現レベルが腫瘍のK-ras変異状況と相関しているかどうかを測定するため、ゲノムDNAを組織検体のサブセットから単離し、PCRで増幅したK-rasエクソン1産物の対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションによって、コドン12でのK-ras変異の存在をスクリーニングした。続いて、コドン12での変異がなかった検体について配列決定してコドン13でのK-ras変異の存在を調べた(表1)。分析した全ての正常組織は、コドン12 (GGT = Gly) およびコドン13 (GGC = Gly) で野生型であった。分析した13の膵臓癌検体のうち、1つの検体はコドン13で変異を有し、10の試料はコドン12で変異しており、85%のK-ras変異頻度に相当した。K-ras変異とCOX-2タンパク質発現の程度との間に直接的な相関関係があるようには思われなかった。たとえば、高レベルのCOX-2タンパク質を発現し、K-rasに変異を持つ試料(すなわち、腫瘍試料#9、16および22)もあったが、変異したK-rasを有する他の試料は、ほとんどまたは全くCOX-2タンパク質を発現しなかった(すなわち、腫瘍試料#3、17、18、19および21)。

#### 【0056】

同様に、公知のK-ras変異状況を有するヒト膵臓腺癌細胞系のパネルにおいて活性化K-rasの発現とCOX-2との間には直接的な相関関係は観察されなかった(25、26)。膵臓腫瘍細胞系で発現したCOX-2の頻度とその量の変動性との両方が原

発性膵臓腺癌における本発明者らの研究結果を反映していた。分析した8つのヒト膵臓腫瘍細胞系のうちで、腫瘍形成性K-rasを発現する7つの細胞系のうちの3つだけが検出可能なレベルのCOX-2タンパク質 (Capan-1、Capan-2およびHPAF-II) を示した (図4 A)。高レベルのCOX-2タンパク質は、高レベルのRas非依存性Raf活性を示す野生型K-ras-発現細胞系BxPC-3においても観察された (26)。Mapキナーゼキナーゼ (MEK) 阻害剤PD98059でBxPC-3細胞系を処理すると、活性リン酸化Erk1/2 Mapキナーゼのレベルは著しく低下したが、合成されるCOX-2の量には影響せず、COX-2発現がErk1/2活性化とは無関係であることを示唆している (図4 B)。総合すると、本発明者らの結果は、Ras経路の活性化は、膵臓腫瘍細胞におけるCOX-2のアップレギュレーションを媒介するには十分でないことを示唆している。本発明者らはまた、3つのハムスターの膵臓細胞系でのCOX-2発現のレベルを比較した。D27/K-rasおよびB12/13形質転換細胞系は、非悪性ハムスター膵臓じん埃細胞系であるD27に由来し、それぞれ腫瘍形成性K-rasでのトランスフェクションまたは化学発癌剤でのインビトロ処理による (22、23)。D27/K-rasおよびB12/13細胞系はいずれも腫瘍形成性K-rasを潜伏させたが、B12/13細胞だけがD27親系と比べて高いレベルのCOX-2タンパク質を示した (図4 C)。これらの結果は、Ras活性化だけでは膵臓癌細胞におけるCOX-2発現をアップレギュレートするのに十分ではないという本明者らの結論を確証し、化学発癌剤への暴露後に起こるさらなる事象が必要な場合があることを示唆している。

#### 【0057】

ヒト膵臓癌細胞系においてCOX-2発現を誘導することができるかどうかを調べるため、4つの細胞系を血清飢餓化し、続いて10% FCSで種々の時間で処理した (図4 D)。COX-2-陽性のBxPC-3およびCapan-1細胞系では、COX-2は、指数関数的に増殖する細胞の場合よりも低いレベルではあったが、血清飢餓後も依然として検出可能であった。FCS刺激の後、これらの細胞系でCOX-2発現を誘導することができた。対照的に、COX-2陰性細胞系のAsPC-1とPaCa-2のいずれにおいても、血清処理によってCOX-2発現を誘導することはできなかった。これらの処理条件下では、Erk1/2が活性化しており (未公表の観察)、Erk 1/2活性化はCOX-2陰性膵臓腫瘍細胞でCOX-2発現を誘導するには十分でないことがここでも示されてい

る。細胞系を腫瘍促進剤であるPMAで処理した際にも同様の結果が観察された（未公表の観察）。

### 実施例 3

#### シクロオキシゲナーゼ阻害剤での膵臓腫瘍細胞系の治療

COX-2-陽性ヒト膵臓腫瘍細胞系のBxPC-3およびCOX-2-陰性細胞系のPaCa-2をCOX阻害剤であるスリンドク、インドメタシン、またはNS-398で処理した。スリンドクおよびインドメタシンはCOX-1もCOX-2も共に阻害する非選択的COX阻害剤であり(27)、NS-398はより特異的なCOX-2の阻害剤である(28)。3日間の処理の後、細胞増殖に対するCOX阻害剤の効果を測定した(図5)。3つの阻害剤の全てが両方の膵臓腫瘍細胞系において用量に応じて細胞増殖を抑制することがわかった。しかしながら、インドメタシンおよびNS-398は、PaCa-2細胞系よりもCOX-2発現細胞系BxPC-3においてより高い程度まで細胞増殖を阻害することがわかった(それぞれ $P=0.004$ および $P<0.001$ )。スリンドクで処理した2つの細胞系では細胞増殖の阻害に大きな差異は観察されなかった( $P=0.333$ )。

#### 【0058】

ヒト膵臓腫瘍細胞系におけるCOX-2の機能活性を評価するため、プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生を酵素免疫測定法により測定した(図6A)。PGE<sub>2</sub>産生はBxPC-3、Capan-1、Capan-2およびHPAF-II細胞系で増加し、これらの細胞系で発現するCOX-2のレベルの上昇と相関していた。対照的に、COX-2陰性膵臓細胞系ではほとんど検出できないレベルのPGE<sub>2</sub>が検出された。PGE<sub>2</sub>産生に対するCOX阻害剤の効果を測定するため、COX-2陽性細胞系のBxPC-3を2種類の異なる濃度のスリンドク(100、250  $\mu$ M)、インドメタシン(10、100  $\mu$ M)、またはNS-398(10、50  $\mu$ M)で24時間インキュベートした後、細胞内のPGE<sub>2</sub>レベルを測定した(図6B)。細胞内レベルは阻害剤処理に応答する変化により敏感であるはずなので、増殖培地に分泌されたPGE<sub>2</sub>ではなく細胞内のPGE<sub>2</sub>を測定した。種々のCOX阻害剤の2種類の濃度は上記の細胞増殖アッセイ(図5)で評価され、高い方の濃度はCOX阻害剤のIC<sub>50</sub>値に相当する。低い方の濃度ではNS-398とインドメタシンとが共にPGE<sub>2</sub>産生をそれぞれ75%および95%阻害したが、対照的に、低い方の濃度のスリンドクはPGE<sub>2</sub>レベルに影響を与えなかった。それでもなお、高い方の



IC<sub>50</sub>濃度の3つの阻害剤全てが、BxPC-3細胞系において細胞内PGE<sub>2</sub>レベルを実質的に、つまり86%から98%抑制した。これらのデータは、COX阻害剤は、PGE<sub>2</sub>産生を減少させることによってCOX-2陽性BxPC-3細胞系で少なくとも部分的にその効果を発揮し得ることを示唆している。しかし、COX-2陰性細胞系では、COX阻害剤の効果はCOXおよびPGE<sub>2</sub>に依存しない機構によって媒介される場合がある。

#### 実施例 4

##### スリンダクとゲムシタビンとの組合せの相乗効果

0 日目にBxPC-3またはPaCa-2細胞を平板培養した。スリンダク (sul、マイクロM)、ゲムシタビン (Gem、nM)、または図6～図7に示すような組合せである化合物を翌日 (1 日目) に添加した。3 日目に細胞をトリプシン化して手動で計数した。それぞれの実験について2つずつ各点をつけた。100%とした培地+溶媒対照試料に存在する細胞の数を基準として細胞数を生存率で表した。スリンダク単独の試料の生存率も示す (Gem、0 nM)。

##### 【0059】

これらのデータは、膵臓腫瘍細胞においてスリンダクとゲムシタビンとの組合せの方がいずれか一方の化合物単独よりも効果的であることを示している。

##### 【0060】

休止細胞では、COX-2の発現は通常検出不能であるが、分裂促進性刺激物および抗炎症剤によって急速に誘導することができる(5、6、29)。近年の研究によって、COX-2発現が結腸、肺、胃、膵臓および食道を含む種々のヒト癌においてアップレギュレートされることが示されている(7～11)。本研究では、対の正常膵臓組織ではほとんど検出できないレベルであるのに対して、ヒト膵臓腫瘍では高レベルのCOX-2タンパク質が発現し、COX-2タンパク質の発現の増加が膵臓の腫瘍形成に相関することを示唆していることを報告する。本発明者らの結果は、膵臓腫瘍でのCOX-2 RNAおよびタンパク質のアップレギュレーションならびに悪性上皮細胞でのCOX-2の局在を示す最近の報告を確認している(11)。より以前の研究では、膜リン脂質からのアラキドン酸の放出を触媒するII型ホスホリパーゼA2の発現が正常膵臓組織に比べて膵臓管腺癌でより高くなることが示されている(30)。さらに、ハムスターのN-ニトロソビス(2-オキソプロピル)アミン(BOP)によっ

て開始される膵臓腫瘍の発達は、2種類のプロスタグランジン合成阻害剤、フェニルブタゾンおよびインドメタシンの投与によって阻害された(31)。インビボおよびインビトロでの本発明者らの観察と合わせると、これらの研究は、COX-2の発現の増加によるプロスタグランジン産生の増加が膵臓腫瘍形成に向けての多段階の進行における重要な事象となる場合があることを示唆している

最近の研究によって、Ras活性化が数種のシステムにおいてCOX-2発現を誘導する場合があることが示唆されている。活性化された腫瘍形成性H-rasは、Rat-1繊維芽細胞で誘導的に発現され、COX-2発現およびPGE<sub>2</sub>産生が付随的に増加した(32)。この特定の細胞系では、特異的マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ(MEK)阻害剤であるPD98059が腫瘍形成性RasによるCOX-2誘導を抑制することがわかり、Rasに依存したCOX-2の誘導にErk1/2活性化が必要なことを示唆している。同様に、高レベルのCOX-2およびプロスタグランジンE<sub>2</sub>がRas形質転換乳房上皮細胞(C57/MG)細胞で検出された(17)。腫瘍形成性K-Rasを発現するヒトの非小細胞性肺癌(NSCLC)細胞系では、Ras変異のないNSCLC系に比べて構成的に高発現のサイトゾルのホスホリパーゼA<sub>2</sub>およびCOX-2により、PGE<sub>2</sub>産生の増加が媒介された(18)。本研究では、腫瘍形成性K-Rasの発現が、原発性ヒト膵臓腺癌におけるCOX-2発現の増加と相関しているかという問題に取り組んだ。本発明者らは、K-ras遺伝子のコドン12または13での変異の存在は、検出可能なレベルのCOX-2タンパク質の発現とは相関していないことを見出した。腫瘍形成性Rasを有する腫瘍のサブセットでCOX-2発現がないのは、膵臓癌腫でErk1/2活性がダウンレギュレートされるからかもしれない(26)。また、高レベルの活性化Erk1/2を示した2つの膵臓腫瘍試料(試料#4および21、データは示されていない)においても本研究では低レベルのCOX-2しか検出されておらず、Erk1/2活性化だけではCOX-2発現を誘導するには十分でないことを示唆している。これらの研究結果は、腫瘍環境において、腫瘍形成性K-rasの存在が、膵臓癌でのCOX-2発現の増加に直接的につながるわけではないことを示唆している。

#### 【0061】

不均質な原発性腫瘍組織に対して均質な細胞の集団の代表であるという理由で調べた膵臓癌細胞系の分析でも、同様の結論に達した。8つの細胞系のうち7つ

においてK-ras変異が活性化したにもかかわらず、検出可能な量のCOX-2タンパク質を発現したのは変異K-rasを有する細胞系のうちの3つだけであった。COX-2発現はまた、高レベルの活性Rafを持つ野生型K-ras BxPC-3細胞系で高かった(26)。COX-2は4つのCOX-2陽性細胞系で構成的に発現したが、対照的に、COX-2陰性細胞系では血清またはPMAによりCOX-2発現を誘導することはできず、これらの細胞ではCOX-2発現が妨害されることが示唆された。MEK阻害剤PD98059での処理後、BxPC-3細胞系でのCOX-2発現は減少せず、この細胞系においてCOX-2誘導はRas経路の活性化とは無関係であることが示唆された。腫瘍形成性Rasでのトランスフェクションか化学発癌剤での処理かのいずれかによって生じた形質転換されたハムスターの膵臓細胞系でのCOX-2タンパク質の発現差異によって、Ras活性化がCOX-2発現の誘導を媒介するには十分でないことがさらに示された。Rasに加えて、他のシグナル経路の活性化が協働して癌細胞におけるCOX-2発現の程度を決定する場合がある。このような経路は、リポ多糖処理されたヒト単球でCOX-2の誘導を調節すると報告されたp38マイトジェン活性化タンパク質キナーゼを含み得る(33)。さらに、ヒト脈管内皮細胞では、NF- $\kappa$ B p65転写因子が低酸素症にตอบสนองしてCOX-2の誘導を媒介することがわかった(34)。従って、COX-2発現の誘導は多数のシグナル経路によって媒介されるものと思われる。活性化される特異的経路は、細胞の種類および刺激によって決まる場合がある。どのシグナル経路が膵臓腫瘍細胞で機能するのかを特定するためにはさらなる実験が必要である。

#### 【0062】

COX-2陽性(BxPC-3)および陰性(PaCa-2)細胞系の両方で、COX阻害剤のスリダク、インドメタシンまたはNS-398での処理によって細胞増殖が阻害された。しかしながら、細胞系BxPC-3は、PaCa-2細胞系に比べてインドメタシンおよびNS-398による増殖阻害への感受性が非常に高く、これら2つの化合物は、スリダクよりもCOX-2発現細胞に対して選択性が高いことを示唆している。さらに、BxPC-3細胞系では、 $IC_{50}$ 濃度のCOX阻害剤が細胞内のPGE<sub>2</sub>レベルを実質的に低下させた。非COX-2発現細胞系では検出可能なPGE<sub>2</sub>は存在しなかった。これらのデータは、COX阻害剤が、膵臓腫瘍細胞系でCOX/PGE<sub>2</sub>依存型および非依存型経路のいずれによってもその阻害効果を発揮することを示唆している。NS-398は、COX-2

とは無関係にアポトーシスを誘導することにより細胞増殖を阻害することが以前より示されている(35)。同様に、COX活性を阻害しないスリンダクの代謝物であるスリンダクスルホンは、ラットモデルにおいてプロスタグランジンのレベルを低下させることなく結腸の発癌現象を阻害することがわかった(36)。さらに、シクロオキシゲナーゼ欠損胚線維芽細胞(cyclooxygenase null embryo fibroblasts)では、NSAIDの形質転換ならびに抗細胞増殖および抗腫瘍作用がCOX発現とは無関係であることが最近示された(37)。

### 【0063】

種々のヒト癌での高レベルのCOX-2の検出および結腸癌でのNSAIDの化学予防的効果によって、COX-2が発癌現象に重要な関わりを持つことが示されている。アポトーシスの阻害(13)、転移可能性の増加(12)および血管新生の促進(14)を含む、COX-2アップレギュレーションの生物学的結果が報告されている。これらの事象は細胞の形質転換および腫瘍の進行に寄与する場合がある。COX-2発現は、分析した患者の膵臓腫瘍試料の55%で著しく高かったので、COX-2を化学療法の新しい目的物として特定した。インビトロで膵臓腫瘍細胞増殖およびPGE<sub>2</sub>産生を阻害するCOX阻害剤の能力を示すこれらの結果は、現在は治療の選択肢がほとんどない膵臓癌患者の治療においてNSAIDが有効な場合があることを示している。COX-2発現は、予後または診断の手段としても有用である。

#### 参考文献：

1. ランディス (Landis) ら, CA Cancer J. Clin., 48, 6-29 (1998).
2. アルモグエラ (Almoguera) ら, Cell, 53, 549-54 (1988).
3. トゥーン (Thun), M. J., Cancer Metastasis Rev., 13, 269-77 (1994).
4. ジャルディエッロ (Giardiello) ら, Eur. J. Cancer, 31A, 1071-6 (1995).
5. ドゥヴィット (DeWitt) ら, Arch. Biochem. Biophys., 306, 94-102 (1993).
6. ハマサキら, Arch. Biochem. Biophys., 304, 226-34 (1993).
7. エバーハート (Eberhart) ら, Gastroenterology, 107, 1183-8 (1994).
8. リスティマキ (Ristimaki) ら, Cancer Res., 57, 1276-80 (1997).
9. ツィンマーマン (Zimmermann) ら, Cancer Res., 59, 198-204 (1999).

10. ウォルフ (Wolff) ら, Cancer Res., 58, 4997-5001 (1998).
11. タッカー (Tucker) ら, Cancer Res., 59, 987-90 (1999).
12. ツジら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 3336-40 (1997).
13. ツジら, Cell, 83, 493-501 (1995).
14. ツジら, Cell, 93, 705-16 (1998).
15. オシマ (Oshima) ら, Cell, 87, 803-9 (1996).
16. シェン (Sheng) ら, Gastroenterology, 113, 1883-91 (1997).
17. スッバラマイア (Subbaramaiah) ら, Cancer Res., 56, 4424-9 (1996).
18. ヒーズリー (Heasley) ら, J. Biol. Chem., 272, 14501-4 (1997).
19. スウ (Hsu) ら, J. Histochem. Cytochem., 29, 577-80 (1981).
20. スミら, Pancreas, 9, 657-61 (1994).
21. コニシら, Cancer, 69, 2293-99 (1992).
22. マンゴールド (Mangold) ら, Carcinogenesis, 15, 1979-84 (1994).
23. ステイルーク (Stayrook) ら, Anticancer Res., 18, 823-8 (1998).
24. リーゼ (Riese) ら, J. Leukoc. Biol., 55, 476-82 (1994).
25. バーロップ (Berrozpe) ら, Int. J. Cancer, 58, 185-91 (1994).
26. イップーシュナイダー (Yip-Schneider) ら, Int. J. Oncol., 15, 271-9 (1999).
27. ミード (Meade) ら, J. Biol. Chem., 268, 6610-4 (1993).
28. フタキら, Prostaglandins, 47, 55-9 (1994).
29. リー (Lee) ら, J. Biol. Chem., 267, 25934-8 (1992).
30. キヨハラら, Int. J. Pancreatol., 13, 49-57 (1993).
31. タカハシら, Carcinogenesis, 11, 393-5 (1990).
32. シェン (Sheng) ら, J. Biol. Chem., 273, 22120-7 (1998).
33. ディーン (Dean) ら, J. Biol. Chem., 274, 264-9 (1999).
34. シュメツテエ (Schmedtje) ら, J. Biol. Chem., 272, 601-8 (1997).
35. エルダー (Elder) ら, Clin. Cancer Res., 3, 1679-83 (1997).
36. ピアッツァ (Piazza) ら, Cancer Res., 57, 2909-15 (1997).
37. チャン (Zhang) ら, J. Exp. Med., 190, 451-59 (1999).

## 【0064】

【表1】

患者サンプルの分析

組織サンプル <sup>a</sup>	組織の種類	% COX-2 <sup>b</sup>	% 癌 <sup>c</sup>	K-ras変異 <sup>d</sup>
1	膵臓腺癌	7.0	10	WT = GGT (Gly)
2	膵臓腺癌	2.0	95	ND
3	膵臓腺癌	0.2	15	GGCからCGC (Arg、コドン13)
4	膵臓腺癌	3.6	35	GGTからGAT (Asp)
4N	正常	0.2	-	GGT
5	膵臓腺癌	5.2	30	GGT
6	膵臓腺癌	0	ND	ND
7	膵臓腺癌	5.9	ND	ND
7N	正常	0	-	ND
8	膵臓腺癌	3.7	ND	ND
9	膵臓腺癌	93	ND	GGTからGAT (Asp)
10	膵臓腺癌	4.8	ND	ND
11	膵臓腺癌	14.2	40	ND
11N	正常	0.1	-	ND
12	膵臓腺癌	16	15	ND
14	膵臓腺癌	31	ND	ND
15	膵臓腺癌	7.8	25	GGTからGAT (Asp)
15N	正常	4.3	-	GGT
16	膵臓腺癌	66	35	GGTからGAT (Asp)
16N	正常	0	-	GGT
17	膵臓腺癌	0.1	40	GGTからGTT (Val)
17N	正常	0.1	-	GGT
18	膵臓腺癌	1.1	40	GGTからGAT (Asp)
18N	正常	0	-	GGT
19	膵臓腺癌	2.2	95	GGTからGAT (Asp)
19N	正常	1.1	-	GGT
20	膵臓腺癌	7.9	30	GGTからCGT (Arg)、TGT (Cys)
20N	正常	1.9	-	GGT
21	膵臓腺癌	0	20	GGTからCGT (Arg)、TGT (Cys)
21N	正常	0.7	-	GGT
22	膵臓腺癌	63.9	15	GGTからGAT (Asp)
22N	正常	0.7	-	GGT
23	膵臓腺癌	15	20	ND
24	膵臓腺癌	0	ND	ND

## 【0065】

a 合計23の膵臓腺癌を入手して表示のように番号を付けた。対の正常隣接組織(N)もまた11人の患者から得た。

b COX-2免疫プロットの濃度測定分析を行なってCOX-2発現率を測定し、100%に

設定した陽性対照を基準として表した。

c パラフィン切片から調製したスライドをヘマトキシリン/エオジン染色して視覚化し、癌の割合を測定した。

d 患者試料から単離したゲノムDNAから生成したK-rasエクソン1PCR増幅産物の対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションによってコドン12でのK-ras変異状態を測定した。K-rasエクソン1PCR増幅産物を配列決定することによってコドン13変異を測定した。

### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

```

<110> Advanced Research and Technology Institute, Inc.
5   Marshall, Mark Steven
    Sweeney, Christopher J.
    Yip-Schneider, Michele T.
    Crowell, Pamela L.

10<120> Use of NSAIDs for the treatment of pancreatic cancer

    <130> 740.018WO1

    <150> US 60/165,543
15<151> 1999-11-15

    <160> 2

    <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
20
    <210> 1
    <211> 20
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens
25
    <400> 1
    atgactgaat ataaacttgt                                20

    <210> 2
30<211> 20
    <212> DNA
    <213> Homo sapiens

    <400> 2
35ctctattgtt ggatcatatt                                20

```

【図面の簡単な説明】

【図 1】 膵臓腺癌および対の正常組織の代表的な免疫プロットの複写写真。

【図 2】 患者試料におけるCOX-2発現率を示す図。

【図 3】 膵臓腫瘍細胞系におけるCOX-2の発現を示す図。3 Aは免疫プロット分析によって検出されたヒト膵臓細胞系におけるCOX-2発現、3 Bは細胞系BxPC-3をMEK阻害剤PD98059またはDMSOで10時間処理した後の活性化MAPキナーゼおよびCOX-2の発現レベル、3 Cは3つのハムスター膵臓細胞系でのCOX-2発現の比較、3 DはCOX-2発現の誘導性を示す図。

【図 4】 膵臓腫瘍細胞系の増殖に対するCOX阻害剤の効果を示す図。

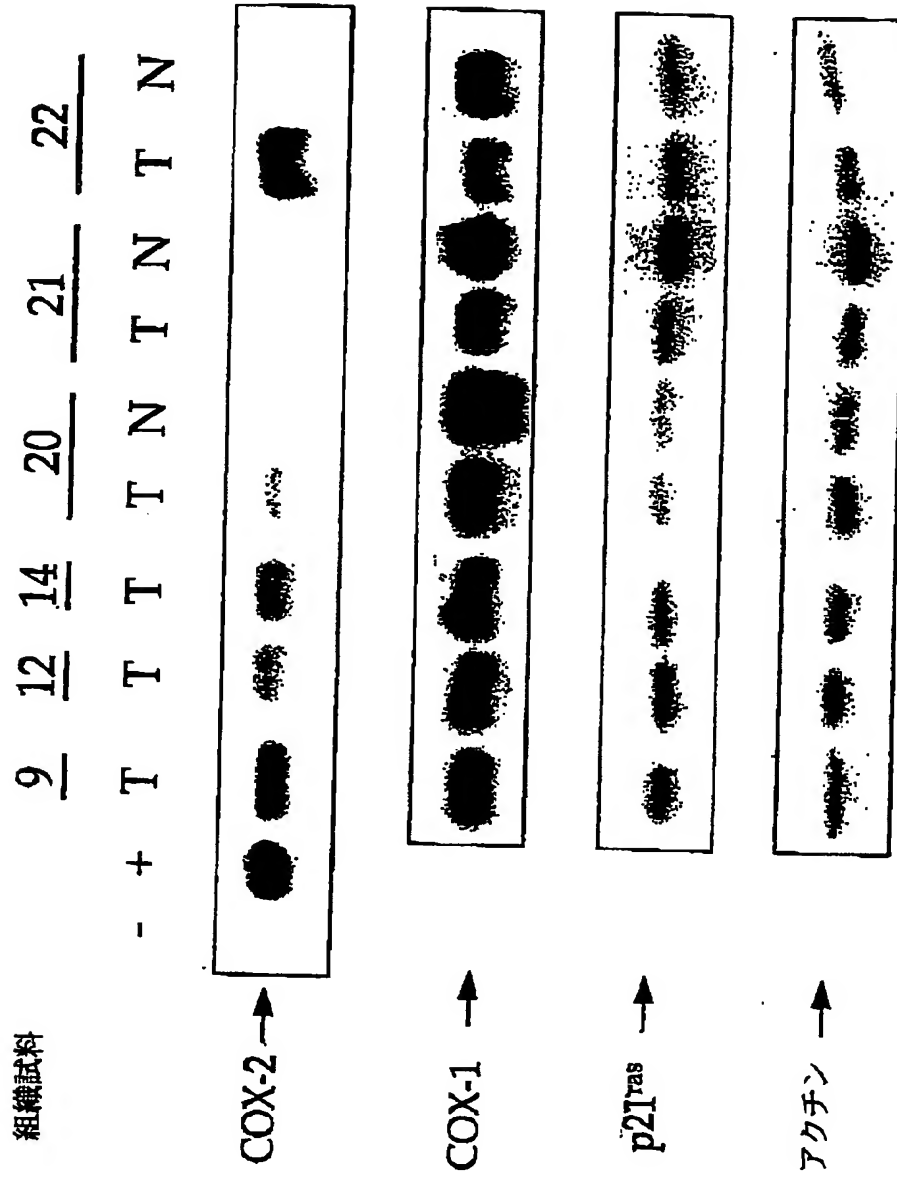
【図 5】 プロスタグランジンE<sub>2</sub>の産生を示す図。5 Aは膵臓腫瘍細胞系におけるPGE<sub>2</sub>レベル、5 BはPGE<sub>2</sub>の産生に対するCOX阻害剤の効果を示す図。

【図 6】 膵臓腫瘍細胞系BxPCの増殖に対するスリンダクとゲムシタビンとの組合せの効果を表すグラフ。

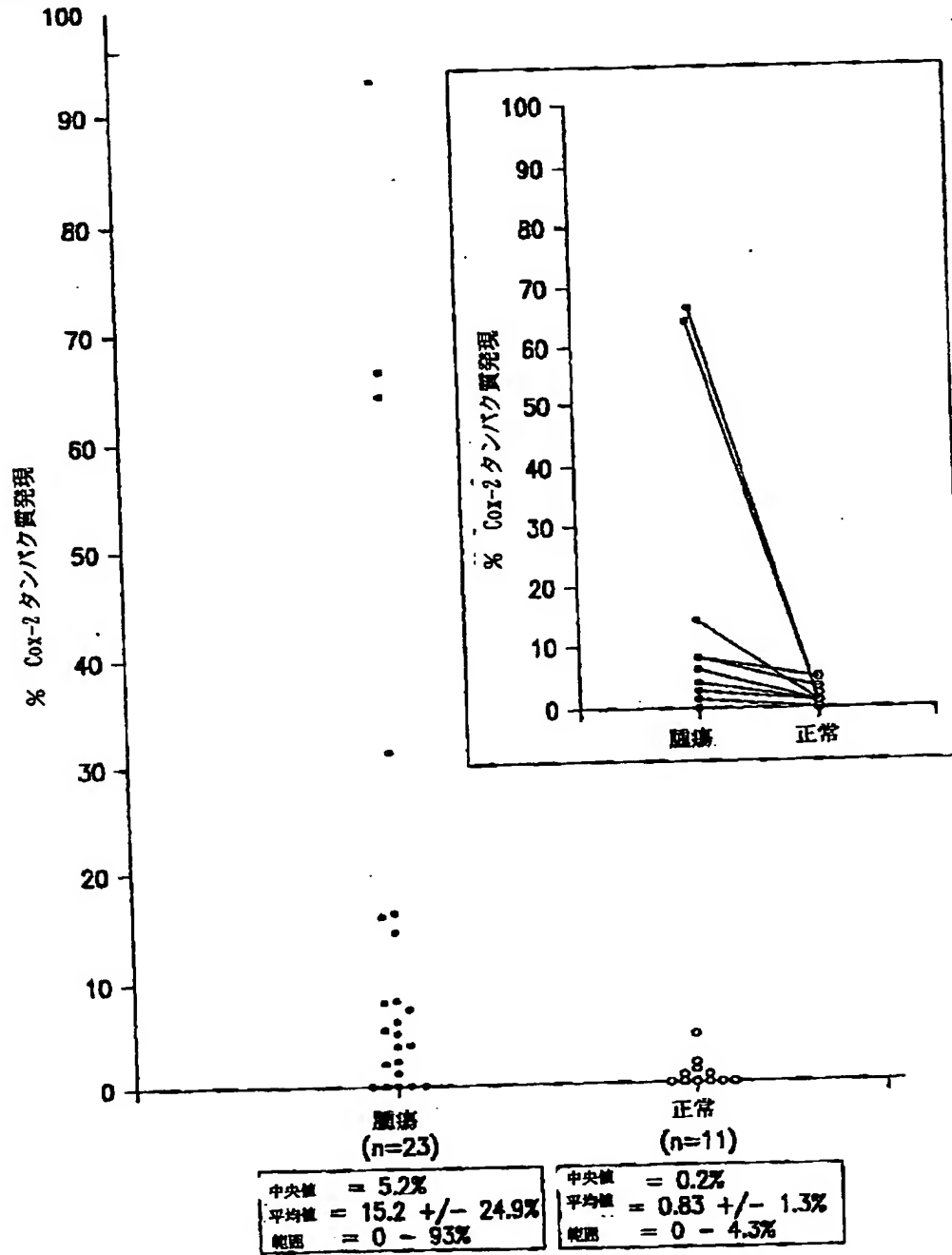
【図 7】 膵臓腫瘍細胞系PaCa-2の増殖に対するスリンダクとゲムシタビンとの組合せの効果を表すグラフ。



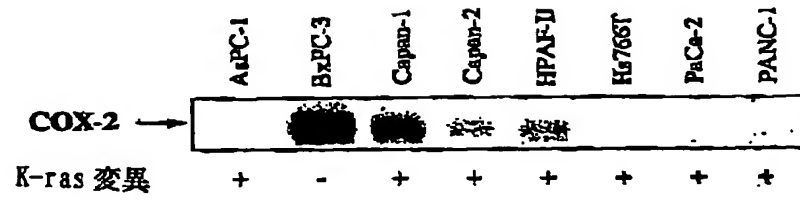
【図 1】



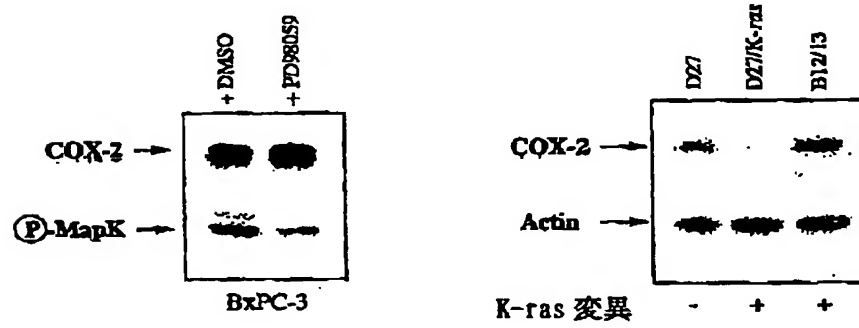
【図 2】



【图 3】

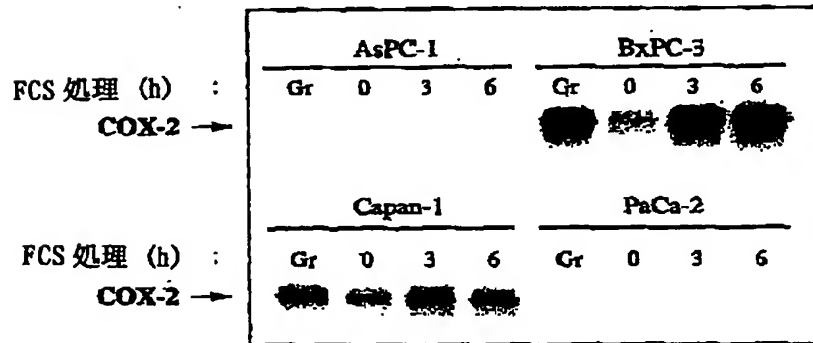


A



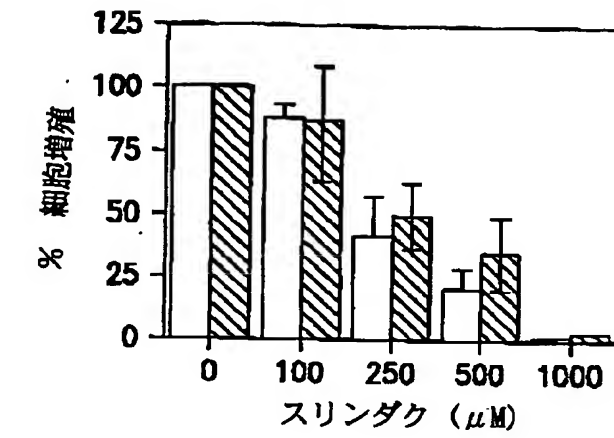
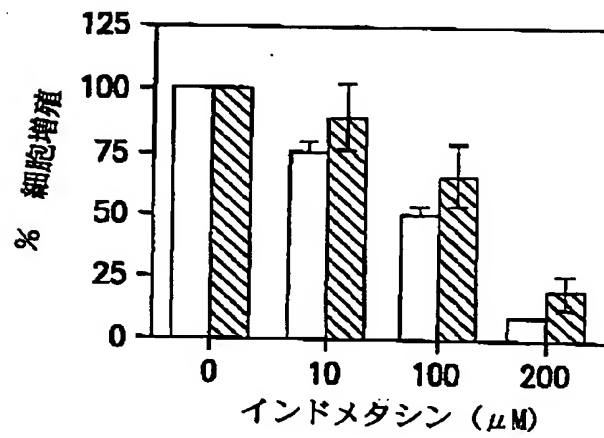
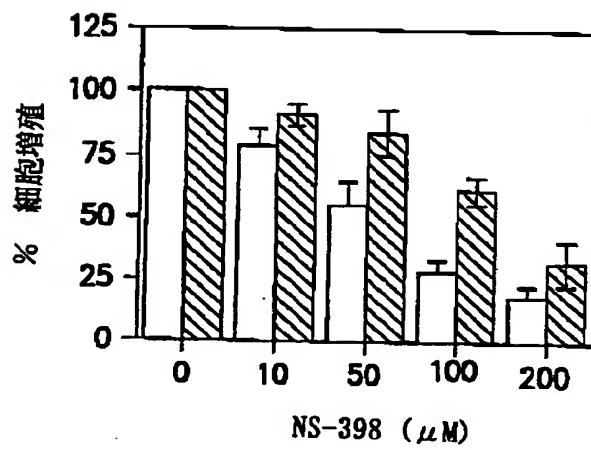
B

C

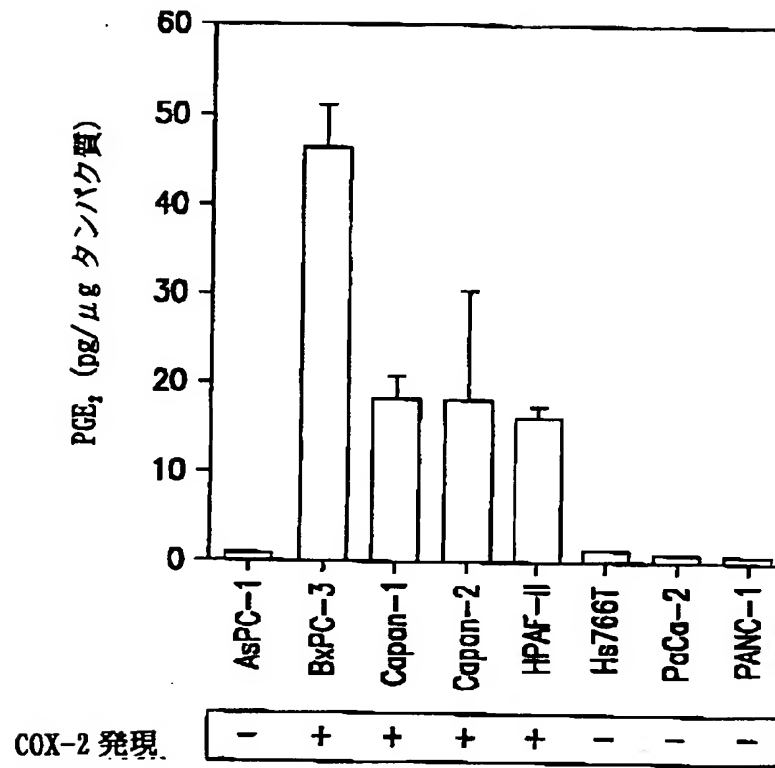


D

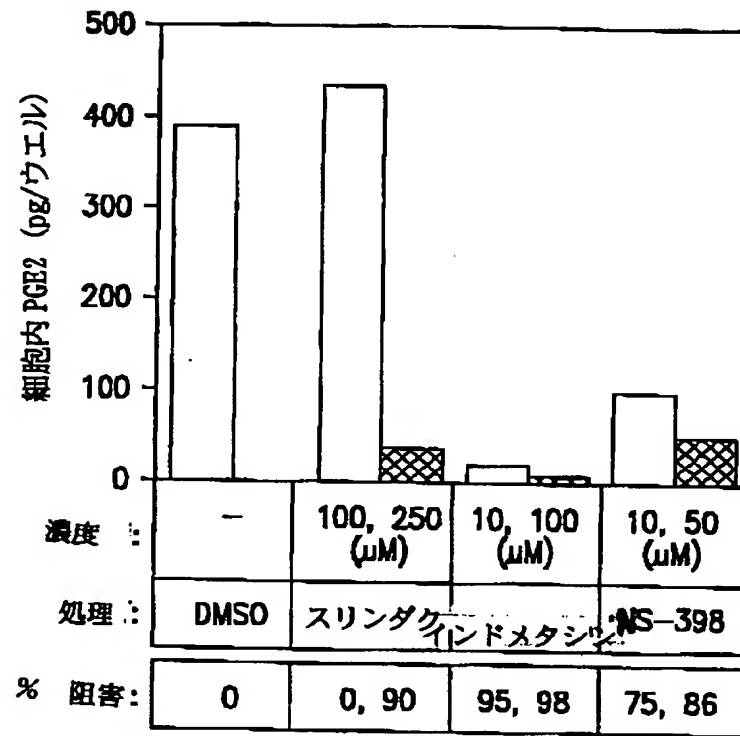
【図 4】

**A****B****C**

【図 5 A】

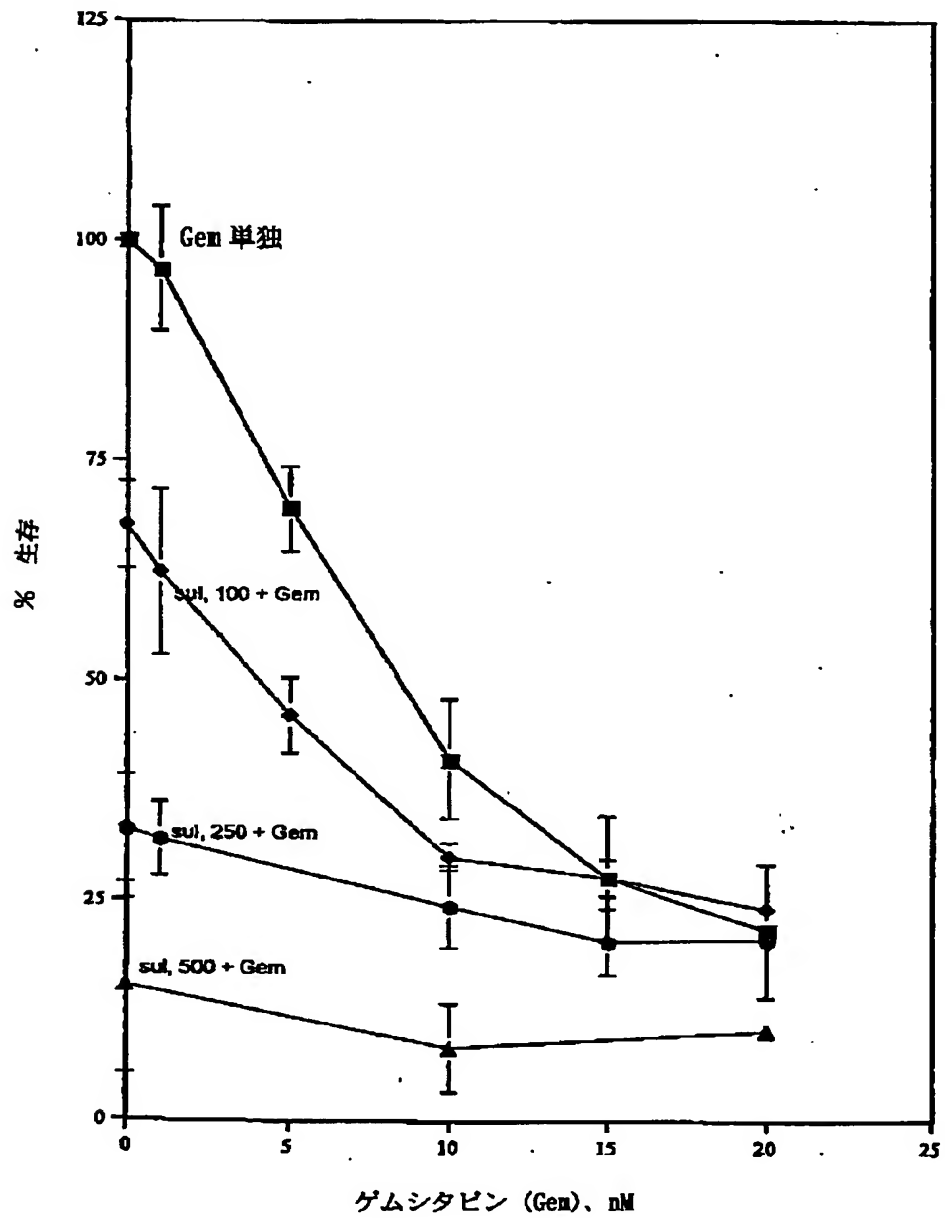


【図5B】



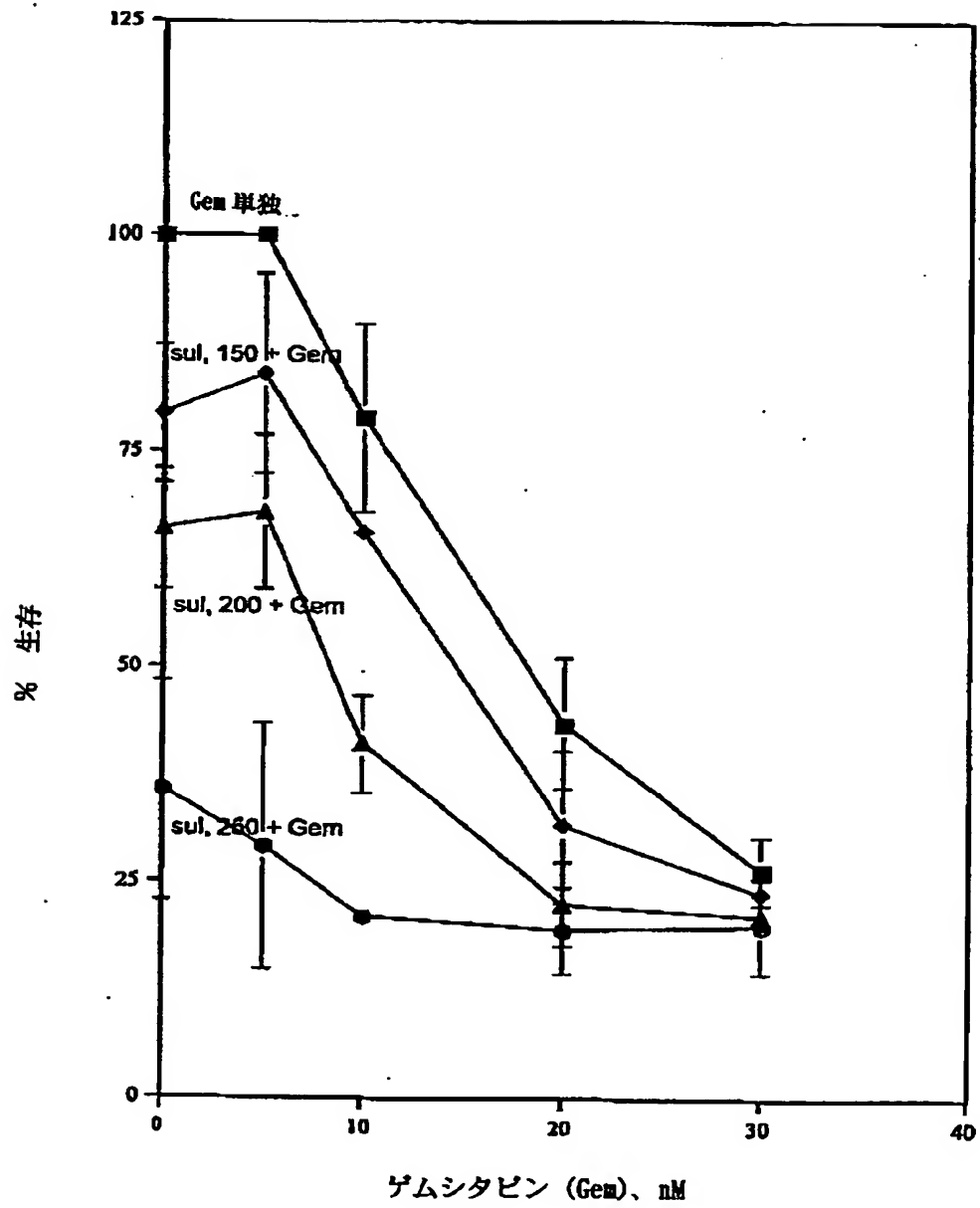
【図 6】

膵臓癌細胞系、BxPC-3 の増殖に対するスリンドク+ゲムシタピンの効果 (3日目)



【図 7】

スリダク+ゲムシタピン、PaCa-2 (3日目)





【手続補正書】 特許協力条約第 3 4 条補正の翻訳文提出書

【提出日】 平成 1 3 年 1 0 月 9 日 ( 2 0 0 1 . 1 0 . 9 )

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 特許請求の範囲

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 癌細胞を有効量のNSAIDに接触させることを含む膵臓癌細胞の生存度を低下させる方法。

【請求項 2】 前記細胞を有効感作量のNSAIDに接触させることによって哺乳類の膵臓癌細胞の化学療法剤への感受性を高めることを含む治療方法。

【請求項 3】 前記細胞を前記膵臓癌細胞の生存度を低下させるのに有効な量の化学療法剤に接触させることをさらに含み、前記用いられる化学療法剤の量が、前記細胞を前記NSAIDに接触させない場合に前記細胞の生存度を同程度に低下させるのに必要となる量より少ない請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記NSAIDが、COX-2阻害剤であるスリンドクまたはその類似体である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】 前記哺乳類の癌細胞がヒト癌細胞である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】 前記スリンドクまたはその類似体が、ヒト癌患者に投与される請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】 前記癌患者が、化学療法剤での治療中である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 前記化学療法剤が、ゲムシタビンである請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】 前記スリンドクまたはその類似体が、経口投与される請求項 4 に記載の方法。

【請求項 1 0】 前記NSAIDおよび前記化学療法剤が、同時に投与される請

請求項 3 に記載の方法。

【請求項 1 1】 前記NSAIDが、前記化学療法剤の投与の前に投与される請求項 3 に記載の方法。

【請求項 1 2】 (a) 膵臓癌細胞の第 1 の部分をヒト膵臓癌患者から単離するステップと；

(b) それらの生存度を測定するステップと；

(c) スリンドクまたはその類似体を前記患者に投与するステップと；

(d) 膵臓癌細胞の第 2 の部分を前記患者から単離するステップと；

(e) 膵臓癌細胞の前記第 2 の部分の生存度を測定するステップと；

(f) ステップ (e) で測定した生存度をステップ (b) で測定した生存度と比較するステップとを含み、ステップ (e) での生存度の低下によって前記細胞が前記化学療法剤に感作されたことが示される、膵臓癌細胞を化学療法剤に感作させるCOX-2阻害剤であるスリンドクまたはその類似体の能力を評価する方法。

【請求項 1 3】 ステップ (b) および (e) が、前記化学療法剤の存在下で行なわれる請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 前記化学療法剤が、ゲムシタビンおよび／または5-FUである請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】 哺乳類の膵臓癌細胞の生存度を低下させるのに有効な薬剤を調製するためのNSAIDの使用方法。

【請求項 1 6】 化学療法剤による殺滅に対して哺乳類の膵臓癌細胞を感作するのに有効な薬剤を調製するためのNSAIDの使用方法。

【請求項 1 7】 前記薬剤が、前記癌細胞の生存度を低下させるのに有効な量の化学療法剤をさらに含み、前記化学療法剤の量が、前記NSAIDが不存在の場合に前記細胞の生存度を同程度に低下させるのに必要となる量よりも少ない請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】 前記NSAIDが、COX-2阻害剤であるスリンドクまたはその類似体である請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】 前記哺乳類の癌細胞が、ヒト癌細胞である請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 20】 前記化学療法剤が、ゲムシタビンである請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】 前記薬剤が、経口投与に適合している請求項 15 または 16 に記載の方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/US 00/31410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K31/19 A61K31/405 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CANCERLIT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	SWEENEY J. ET AL.: "INHIBITION OF CELL GROWTH IN PANCREATIC TUMOR CELLS BY ANTI-INFLAMMATORY DRUGS" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 41, March 2000 (2000-03), page 527 XP002164391 USA ABSTRACT #3358 abstract --- -/-	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 March 2001		Date of mailing of the international search report 18.04.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentstr. 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax (+31-70) 340-3018		Authorized officer ECONOMOU, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC 7/US 00/31410

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MARSHALL M.S. ET AL.: "SUPPRESSION OF PANCREATIC DUCTAL ADENOCARCINOMA GROWTH BY SULINDAC" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, vol. 41, March 2000 (2000-03), page 526 XP002164392 USA ABSTRACT #3349 abstract	1-11
P,X	T.YIP-SCHNEIDER M. ET AL.: "COX-2 EXPRESSION IN HUMAN PANCREATIC ADENOCARCINOMAS" CARCINOGENESIS, vol. 21, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 139-146, XP000984815 the whole document	1-11
X	MOLINA M. ET AL.: "INCREASED COX-2 EXPRESSION IN HUMAN PANCREATIC CARCINOMAS AND CELL LINES: GROWTH INHIBITION BY NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS" CANCER RESEARCH, vol. 59, no. 17, September 1999 (1999-09), pages 4356-4362, XP000984712 the whole document	1-11
X	WO 99 49859 A (THE ARIZONA BOARD OF REGENTS) 7 October 1999 (1999-10-07) claims 1-21,6	1-6,8
X	WO 97 48391 A (ADVANCED RESEARCH AND TECHNOLOGY INSTITUTE) 24 December 1997 (1997-12-24) page 9, line 18 -page 11, line 7 claims 1-19	1-8
P,X	WO 00 38730 A (G.D. SEARLE & CO.) 6 July 2000 (2000-07-06) claims 1-99 example 6	1-8

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 00/31410

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9949859 A	07-10-1999	AU 3366399 A EP 1067919 A	18-10-1999 17-01-2001
WO 9748391 A	24-12-1997	AU 3641597 A	07-01-1998
WO 0038730 A	06-07-2000	AU 2207000 A AU 2209800 A AU 2210400 A AU 2380500 A AU 2592600 A AU 2593600 A AU 2713400 A AU 2713500 A AU 2713600 A WO 0038715 A WO 0038716 A WO 0038665 A WO 0038717 A WO 0038786 A WO 0038718 A WO 0038719 A WO 0037107 A	31-07-2000 31-07-2000 31-07-2000 31-07-2000 31-07-2000 12-07-2000 31-07-2000 31-07-2000 31-07-2000 06-07-2000 06-07-2000 06-07-2000 06-07-2000 06-07-2000 06-07-2000 06-07-2000 29-06-2000

## フロントページの続き

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(71) 出願人 スウィーニー、クリストファー、ジェイ。  
アメリカ合衆国、46202 インディアナ州、  
インディアナポリス、ウエスト ウォルナ  
ット ストリート、アパートメント ビ  
ー、 725

(71) 出願人 イブーシュナイダー、ミッシェル、ティ  
ー。  
アメリカ合衆国、46033 インディアナ州、  
カーメル、レッド オーク レーン 75

(71) 出願人 クロウエル、パメラ、エル。  
アメリカ合衆国、46033 インディアナ州、  
カーメル、チャリング クロス ロード  
12715

(72) 発明者 マーシャル、マーク、スティーブン  
アメリカ合衆国、46033 インディアナ州、  
カーメル、スプリース コート 1519

(72) 発明者 スウィーニー、クリストファー、ジェ  
イ。  
アメリカ合衆国、46202 インディアナ州、  
インディアナポリス、ウエスト ウォルナ  
ット ストリート、アパートメント ビ  
ー、 725

(72) 発明者 イブーシュナイダー、ミッシェル、ティ  
ー。  
アメリカ合衆国、46033 インディアナ州、  
カーメル、レッド オーク レーン 75

(48)

(72) 発明者 クロウエル、パメラ、エル、  
アメリカ合衆国、46033 インディアナ州、  
カーメル、チャリング クロス ロード  
12715

Fターム(参考) 4C084 AA17 MA52 NA14 ZB261  
4C086 AA01 AA02 EA17 MA01 MA04  
MA52 ZB26  
4C206 AA01 AA02 DA23 MA01 MA04  
MA72 NA14 ZB26